



## Investigation of Contamination Rate and Determination of Pattern of Antibiotic Resistance in Coagulase Positive Staphylococcus aureus Isolated from Domestic Cheeses in Maragheh, Iran

### ARTICLE INFO

#### Article Type

Original Research

#### Authors

Mahdavi S.\*<sup>1</sup> PhD,  
Isazadeh A.R.<sup>2</sup> MSc

#### How to cite this article

Mahdavi S, Isazadeh A.R. Investigation of Contamination Rate and Determination of Pattern of Antibiotic Resistance in Coagulase Positive Staphylococcus aureus Isolated from Domestic Cheeses in Maragheh, Iran. Pathobiology Resear-ch. 2019;22(2):85-89.

<sup>1</sup>Microbiology Department, Basic Sciences Faculty, Maragheh Branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran

<sup>2</sup>Genetics Department, Basic Sciences Faculty, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

#### \*Correspondence

Address: Maragheh Branch, Islamic Azad University, Shahid Derakhsi Boulevard, Maragheh, East Azarbaijan, Iran.

Phone: +98 (41) 37457072

Fax: +98 (41) 37457072

S.mahdavi@iau-maragheh.ac.ir

#### Article History

Received: April 15, 2018

Accepted: February 20, 2019

ePublished: June 20, 2019

### ABSTRACT

**Aims** The aim of this study was investigation of contamination rate and determination of pattern of antibiotic resistance in coagulase positive Staphylococcus aureus isolated from domestic cheeses in Maragheh, Iran.

**Materials & Methods** In this experimental study, 100 traditional white brine cheese samples were collected from different villages of Maragheh with the observance of aseptic principles and transferred to microbiology laboratory of Islamic Azad University, Maragheh branch. The samples were cultured in specific media and the complementary biochemical tests were done for the identification of coagulase positive Staphylococcus aureus. For molecular diagnosis of S.aureus, these isolates were identified as S.aureus with the proliferation of Thernonuclease species-specific gene (nuc) by polymerase chain reaction (PCR) method. Cheese samples were tested for pH and NaCl content. The susceptibility of all isolates to different antibiotics was evaluated by kirby-bauer's method.

**Findings** Of 100 samples taken from villages of Maragheh, 21 samples (21%) were identified as Staphylococcus aureus coagulase positive. 20 isolates were resistant to more than one antibiotic. The most resistance of isolates were to penicillin, vancomycin, and methicillin, respectively. No significant difference was shown among old and fresh samples in Staphylococcus aureus incidence ( $p>0.05$ ).

**Conclusion** Considering the high contamination rate of domestic cheese by coagulase positive Staphylococcus aureus in Maragheh, the production and distribution of these cheeses should be under hygienic situations. Efficient informing about the potential risk of using these products seems necessary.

**Keywords** Staphylococcus aureus; Cheese; Antibiotic resistance

### CITATION LINKS

[1] Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries [2] Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries [3] Identification and typing of food-borne Staphylococcus aureus by PCR-based techniques [4] Aflatoxin M1 in white pickle and Van otlu (herb) cheeses consumed in southeastern Turkey [5] Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK [6] Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese [7] Animal Bacterial Diseases [8] Contamination of Chicken Meat With Salmonella spp Distributed in Mahabad City, Iran [9] Investigating the Presence and Expression of stx1 Gene in Escherichia coli Isolated From Women With Urinary Tract Infection Using Real-Time PCR in Tabriz, Iran [10] Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene [11] Toxicity testing and chemical analyses of recycled fibre-based paper for food contact [12] Biostatistics for animal science [13] Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins [14] Occurrence of coagulase-positive staphylococci in cheddar cheese [15] Identification of some enterotoxigenic strains of staphylococci from locally processed cheese [16] Prevalence of coagulase positive pathogenic Staphylococcus aureus in milk and milk products collected from unorganized sector of Agra [17] Investigation of contamination of cheeses in Mashhad and Quchan to Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus and Escherichia coli pathogens [18] Occurrence and molecular characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from meat and dairy products by PCR-RFLP [19] Lactobacillus casei suppresses hfq gene expression in Escherichia coli O157:H7

## مطالعه میزان آلودگی پنی‌های سنتی شهرستان مراغه به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها

سامان مهدوی \* PhD

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

علیرضا عیسی‌زاده MSc

گروه ژنتیک، دانشکده علوم پایه، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

### چکیده

**اهداف:** هدف مطالعه حاضر، بررسی میزان آلودگی پنی‌های سنتی شهرستان مراغه به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها بود.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه تجربی حاضر ۱۰۰ نمونه پنی‌ها از روستاهای شهرستان مراغه با رعایت اصول بهداشتی جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه منتقل شد. کشت نمونه‌ها در محیط‌های کشت اختصاصی و انجام آزمایشات بیوشیمیایی تکمیلی به منظور تشخیص استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت انجام شد. برای تشخیص مولکولی باکتری، با تکثیر ژن ترمونوکلاز اختصاصی گونه (*nuc*) به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شدند. اندازه‌گیری pH و میزان نمک پنی‌ها نیز در مورد تمام نمونه‌ها صورت گرفت. همچنین آزمایش حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به روش کربی‌پوتر در مورد تمام جدایه‌ها انجام شد.

**یافته‌ها:** از ۱۰۰ نمونه اخذ شده از روستاهای شهرستان مراغه، ۲۱ مورد (۲۱٪) استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت تشخیص داده شد. ۲۰ جدایه به بیش از یک نوع آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های به دست آمده به ترتیب نسبت به پنی‌سیلین، وانکومایسین و متی‌سیلین بود. تفاوت معنی‌داری در میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در پنی‌های کهنه و تازه مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** با توجه به میزان بالای آلودگی پنی‌های سنتی در روستاهای شهرستان مراغه به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت، تولید و توزیع آنها باید تحت شرایط بهداشتی صورت گیرد و لزوم اطلاع‌رسانی کافی در مورد خطرات بالقوه استفاده از آنها امری ضروری است.

**کلیدواژه‌ها:** استافیلوکوکوس اورئوس، پنی‌های سنتی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۰۱

\* نویسنده مسئول: s.mahdavi@iau-maragheh.ac.ir

شیر خام به منظور تهیه و ساخت پنیر استفاده کرده یا شیر خام را به آب پنیر اضافه می‌کنند. این امر برای خوش طعمی پنیر لازم بوده و موجب پروتئولیز و لیپولیز بیشتری توسط میکروفلور شیر خام در پنیر می‌شود<sup>[۱]</sup>. تحقیقات دقیق نشان داده که منابع آلودگی پنیر شامل شیر خام، شیر با پاستوریزاسیون ناقص یا آلودگی مجدد شیر پاستوریزه با میکروب‌های ناشی از شیر خام و همچنین محیطی که در آن پنی‌سازی انجام می‌شود، است<sup>[۲]</sup>. مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکوس به دلیل خوردن سم مقاوم به حرارت (انترتوکسین) تولید شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت است و موجب عفونت و ورم پستان در نشخوارکنندگان شده و در نتیجه موجب آلودگی شیر و انتقال آن به مصرف‌کنندگان می‌شود<sup>[۳]</sup>. عوامل مهمی در بقای باکتری، تکثیر و حدت آن موثرند که مقاومت وابسته به کواگولاز در برابر عوامل ضدباکتریایی سرم از آن جمله است<sup>[۴]</sup>. عوامل زیادی مثل pH، جمعیت اولیه استافیلوکوکوس اورئوس موجود در شیر خام و دمای نگهداری، نقش مهمی در تولید انترتوکسین توسط این باکتری در جریان تهیه پنیر داشته و محصولات لبنی غیرصنعتی می‌توانند منبع مسمومیت‌های غذایی باشند، زیرا انترتوکسین با عمل پاستوریزاسیون غیرفعال نمی‌شود و در غذا برای مدت طولانی فعال باقی می‌ماند<sup>[۵]</sup>. افرادی که در تهیه مواد غذایی فعالیت دارند در صورت عدم رعایت مسایل بهداشتی، باکتری را به غذا انتقال می‌دهند و اگر تعداد  $10^5$  باکتری در هر گرم ماده غذایی وجود داشته باشد، باکتری فرصت رشد و تولید انترتوکسین را می‌یابد<sup>[۶]</sup>. به علت پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، روزه‌روز از تعداد آنتی‌بیوتیک‌های موثر برای درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری کاهش می‌یابد به طوری که برخی از سویه‌ها حتی نسبت به تعداد زیادی از ترکیبات ضد میکروبی، اعم از آنتی‌بیوتیک‌ها و ضد عفونی‌کننده‌ها، مقاومت نشان داده‌اند<sup>[۷]</sup>. با توجه به نقش مهم لبنیات در چرخه غذایی خانواده‌ها و استفاده مردم روستایی از لبنیات سنتی و عدم تمایل آنها برای استفاده از محصولات لبنی پاستوریزه، این تحقیق با هدف مطالعه میزان آلودگی پنی‌های سنتی شهرستان مراغه به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت و تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آنها صورت گرفت.

### مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری:** مطالعه تجربی حاضر از اسفند سال ۹۱ تا مهر سال ۹۲ روی ۱۰۰ نمونه پنیر سنتی اخذ شده از روستاهای شهرستان مراغه انجام شد.

**کشت و جداسازی:** تعداد ۱۰۰ گرم نمونه پنیر سنتی از هر خانوار روستایی در ظروف استریل گرفته شد و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. نمونه‌ها پس از همگن شدن به میزان ۱۰ گرم در ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت جیولیتی‌کانتونی‌براث به همراه تلوریت پتاسیم ۱٪ کشت و در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از تیره شدن رنگ محیط کشت، یک لوپ به محیط کشت بردارگر به همراه تلوریت پتاسیم ۱٪ منتقل و در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. کلنی‌های سیاه‌رنگ موجود در محیط کشت بردارگر رنگ آمیزی گرم شده و پس از مشاهده کوس‌های گرم مثبت زیر میکروسکوپ، به محیط کشت مانیتول‌سالت‌آگار منتقل و در دمای  $35^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در صورت زرد رنگ شدن محیط کشت مانیتول‌سالت‌آگار، روی کلنی‌های بی‌رنگ تست و گس پروسکائر (VP) و کواگولاز انجام شد.

### مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین عوامل مسمومیت غذایی است که به خصوص از طریق فرآورده‌های لبنی منتقل می‌شود. مسمومیت حاصل از این باکتری، یکی از شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی است و در اغلب کشورها از نظر وقوع در لیست سه مسمومیت درجه اول قرار دارد<sup>[۱]</sup>. تحقیقات مختلف نشان داده که یک تا ۵٪ مسمومیت‌های ناشی از مواد غذایی با مصرف شیر و محصولات لبنی مرتبط است که ۵۳٪ موارد عفونت‌های ناشی از آن به علت پنی‌های آلوده است<sup>[۲]</sup>. مسمومیت‌های غذایی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس با علائم تهوع، استفراغ، انقباضات شدید عضلات شکم، اسهال، لرز، ناتوانی، تعریق، شوک، تنفس کم عمق و حرارت بدن پایین‌تر از حد طبیعی است<sup>[۳]</sup>. آرایه آمار دقیق وقوع مسمومیت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس به دلیل عدم گزارش آن در بسیاری از موارد، مشکل است<sup>[۳]</sup>. پنی‌های تهیه شده از شیرهای غیرپاستوریزه منبع اصلی بیماری‌هایی از جمله مسمومیت‌های غذایی ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس است<sup>[۴]</sup>. بسیاری از تولیدکنندگان پنیر از

اکساسیلین (یک میکروگرم)، پنی سیلین (۱۰ میکروگرم) و متی سیلین به میزان ۵ میکروگرم (پادتن طب؛ ایران) به روش کربی بوئر به منظور بررسی حساسیت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت جدا شده، استفاده شد. از سوش استاندارد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) به عنوان شاهد استفاده شد. پس از مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون، قطر هاله ممانعت از رشد نمونه‌ها پس از اندازه گیری و مراجعه به جدول شرکت سازنده آنتی بیوتیکی ثبت شد.

**روش آماری:** از یک مدل لجستیک برای توضیح تغییرات نسبت دو جمله‌ای P (شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر) ناشی از تغییرات متغیر مستقل X (pH یا درصد نمک پنیر) استفاده شد:

$$\text{Log} [pi/(1-pi)] = \beta_0 + \beta_1 x_i$$

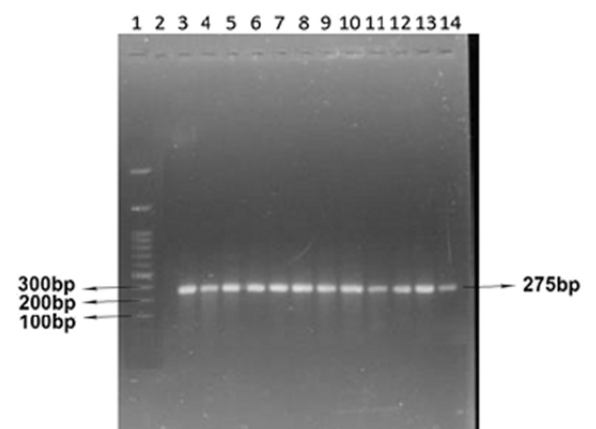
$pi$ : میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر برای مشاهده  $i$   
 $X_i$ : pH یا درصد نمک پنیر برای مشاهده  $i$   
 $\beta_1, \beta_0$ : پارامترهای رگرسیون  
 برای آزمون نسبت‌های پنیر آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس بین نمونه‌های کهنه و تازه مدل زیر استفاده شد [12]:

$$Hi = \log [pi/(1-pi)] = m + \tau_i$$

$i = A, B, C$   
 $pi$ : میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در پنیر در رابطه با سن نمونه  $i$   
 $m$ : میانگین کلی نسبت شیوع در مقیاس لگاریتمی  
 $Ti$ : تاثیر سن نمونه  $i$

### یافته‌ها

از ۱۰ نمونه پنیر سنتی اخذ شده از روستاهای شهرستان مراغه، ۲۱ مورد (۲۱٪) آلوده به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت بودند و ۷۹ مورد (۷۹٪) منفی گزارش شدند. همه جدایه‌های باکتریایی (۲۱ جدایه) که پس از آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس شناسایی شده بودند، در آزمون PCR از نظر ژن ترمونوکلاز ( $nuc$ ) اختصاصی گونه استافیلوکوکوس اورئوس مثبت بودند (شکل ۱). آماره‌های توصیفی مربوط به متغیرهای مورد مطالعه در جدول ۲ ذکر شده است.



**شکل ۱** الکتروفورز محصول PCR در آگارز ۱/۵٪ (به ترتیب از سمت چپ به راست شامل موارد زیر است: شماره ۱: (۱۰۰ جفت باز) مارکر، شماره ۲: کنترل منفی (آب دوبار تقطیر)، شماره ۳: کنترل مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112)، شماره ۴-۱۴: جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد آزمایش، محل‌های تشکیل باند: ۲۷۵ جفت باز)

**استخراج DNA:** استخراج DNA از ۲۱ نمونه کشت داده شده باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در محیط آبگوشت قلب- مغز (مرک؛ آلمان) انجام شد. یک میلی لیتر از کشت‌های باکتریایی با شدت  $5 \times 10^8$  به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و مایع رویی دور ریخته شد. بعد از افزودن یک میلی لیتر بافر لیزکننده شامل تریس یک مولار (۷/۵ pH)، کلرید سدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار، C- TAB ۲٪ روی رسوب مخلوط، در دمای  $85^\circ\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری قرار داده شد و سپس ویال‌های حاوی سلول‌های لیز شده به مدت ۵ دقیقه با شدت  $12 \times 10^4$  سانتریفیوژ و مایع رویی به ویال‌های دیگر منتقل و هم‌حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل با نسبت ۲۴:۱ به آن اضافه و به آرامی تکان داده شد. پس از تشکیل دو فاز مایع در ویال و برداشت لایه رویی و انتقال آن به تیوپ  $1/5$  میلی لیتری دیگر،  $0/5$  میکرو لیتر RNAase به آن اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  در بن‌ماری قرار گرفت. بعد از ۳۰ دقیقه، ویال‌ها را برداشته و هم‌حجم آنها ایزوپروپانول اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $-20^\circ\text{C}$  قرار داده شد و با سانتریفیوژ با شدت  $12 \times 10^4$  DNA ترسیب و با قراردادن ویال‌ها در دمای اتاق، DNA خشک شد. در پایان، DNA خشک شده در  $50$  میکرو لیتر آب دیونیزه حل شد [9].

**آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای شناسایی ژن ترمونوکلاز ( $nuc$ ):** واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم  $25$  میکرو لیتر، شامل کیت مستر PCR به مقدار  $12/5$  میکرو لیتر، پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱)  $0/4$  میکرو مولار و DNA استخراج شده شامل یک میکرو لیتر ( $50$  نانوگرم) صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در  $94^\circ\text{C}$  به مدت ۴ دقیقه،  $32$  چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در  $94^\circ\text{C}$  به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای  $55^\circ\text{C}$  به مدت یک دقیقه، بسط در  $72^\circ\text{C}$  به مدت یک دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در  $72^\circ\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR در آگارز  $1/5$ ٪ الکتروفورز شده و با استفاده از ژل‌داک عکس برداری شد. از DNA استخراج شده استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای کنترل منفی از آب دوبار تقطیر استفاده شد. جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس پس از تشخیص قطعی وجود ژن ترمونوکلاز به طول تقریبی  $275$  جفت باز به عنوان استافیلوکوکوس اورئوس در نظر گرفته شدند.

**جدول ۱** توالی پرایمرهای اختصاصی مربوط به ژن ترمونوکلاز و اندازه محصول PCR حاصل از آن [10]

نام ژن	توالی	اندازه محصول (جفت باز)
$nuc$	5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3' 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACATAAAGC-3'	۲۷۵

**اندازه‌گیری pH و نمک نمونه‌های پنیر:** هم‌زمان با کشت نمونه‌های پنیر، pH پنیر توسط دستگاه pH سنج HORIBA مدل F12 (هوریبا؛ ژاپن)، همچنین میزان نمک نمونه‌های پنیر نیز با روش تیتراسیون موهر اندازه‌گیری شدند [11].

**تست آنتی بیوگرام روی نمونه‌های جدا شده:** از باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت جدا شده از نمونه‌های پنیر، تست آنتی بیوگرام در محیط مولر هینتون آگار انجام شد. از دیسک‌های آنتی بیوگرام اریترومایسین (۱۵ میکروگرم)، سیپروفلوکسازین (۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، وانکومایسین (۳۰ میکروگرم)،

متغیر	تعداد	میانگین آماری	حداقل	حداکثر
اسیدیته	۱۰۰	۴/۷۳±۰/۵۳۳	۳/۳۵	۶/۶۴
نمک	۱۰۰	۵/۳۶±۱/۸۶۹	۱/۲۰	۱۱/۶۰
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۱	۰/۲۱±۰/۴۰۹	۰	۱/۰۰

میزان کای مربع به دست آمده برای آزمون تاثیر pH بر شیوع استافیلوکوکوس اورئوس برابر ۰/۰۱ ( $p > ۰/۰۵$ ) به دست آمد که نشان دهنده عدم تاثیر معنی دار pH بر شیوع استافیلوکوکوس اورئوس است. ضریب همبستگی پیرسون بین pH و درصد نمک پنیر برابر ۰/۱۴ به دست آمد که نشان دهنده عدم همبستگی معنی دار بین این دو پارامتر است. میزان کای مربع به دست آمده برای آزمون تاثیر میزان نمک پنیر بر شیوع استافیلوکوکوس اورئوس برابر ۱/۳۷ بود که نشان دهنده عدم تاثیر معنی دار درصد نمک پنیر بر شیوع استافیلوکوکوس اورئوس است ( $p > ۰/۰۵$ ). اختلاف نسبت شیوع بین نمونه های تازه (کمتر از ۳ ماه) و کهنه (بیشتر از ۳ ماه) پنیر برابر ۰/۰۲۸۵ بوده و آماره کای مربع آن ۰/۱۱ ( $p > ۰/۰۵$ ) به دست آمد، یعنی هیچ تفاوت معنی داری در میزان شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در پنیرهای تازه و کهنه مشاهده نشد (جدول ۳).

تمام جدایه های به دست آمده نسبت به آنتی بیوتیک پنی سیلین مقاوم بودند. بیشترین میزان حساسیت جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیک های اکساسیلین و جنتامایسین بود. تعداد ۲۰ جدایه (حدود ۹۵/۲٪) به بیش از یک آنتی بیوتیک مقاوم بودند. بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه ها به ترتیب نسبت به پنی سیلین، وانکومایسین و متی سیلین بود. در میان جدایه های به دست آمده، یک جدایه به تمام آنتی بیوتیک های مورد آزمایش مقاوم بود (جدول ۴).

پنیرهای کمتر از ۳ ماه از تاریخ تولید به عنوان پنیرهای تازه و پنیرهای بیشتر از ۳ ماه از تاریخ تولید به عنوان پنیرهای کهنه در نظر گرفته شد.

جدول ۳) مقایسه نسبت شیوع استافیلوکوکوس اورئوس در پنیرهای تازه و کهنه

سن پنیر	تعداد نمونه	تعداد نمونه مثبت	نسبت شیوع	انحراف معیار
تازه	۶۵	۱۳	۰/۲	۰/۳۱۰۱
کهنه	۳۵	۸	۰/۲۲۸۵	۰/۴۰۲۵

پنیرهای کمتر از ۳ ماه از تاریخ تولید به عنوان پنیرهای تازه و پنیرهای بیشتر از ۳ ماه از تاریخ تولید به عنوان پنیرهای کهنه در نظر گرفته شد.

جدول ۴) نتایج آنتی بیوگرام به دست آمده از پنیرهای سنتی روستاهای شهرستان مراغه

آنتی بیوتیک	علامت اختصاری (میکروگرم)	غلظت دارو	سویه های استافیلوکوکوس اورئوس	
			کواگولاز مثبت حساس (%)	نیمه حساس (%)
اریترومایسین	E	۱۵	۰ (۲۳/۸)	۱۶ (۷۶/۲)
سپروفلوکسازین	CP	۵	۶ (۲۸/۵)	۱۰ (۴۷/۷)
تتراسایکلین	TE	۳۰	۶ (۲۸/۵)	۶ (۲۸/۵)
جنتامایسین	GM	۱۰	۱۲ (۵۷/۲)	۳ (۱۴/۳)
وانکومایسین	V	۳۰	۱ (۴/۷)	۱۹ (۹۰/۶)
اکساسیلین	OX	۱	۱۳ (۶۲)	۸ (۳۸)
پنی سیلین	P	۱۰	۰	۲۱ (۱۰۰)
متی سیلین	ME	۵	۵ (۲۳/۸)	۱۶ (۷۶/۲)

### بحث

در این تحقیق میزان آلودگی پنیرهای سنتی روستاهای شهرستان

مراغه به باکتری استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت ۲۱٪ بود که با نتایج پژوهش برخی از محققین مطابقت دارد. مرحمتی زاده و همکاران ضمن بررسی آلودگی ۵۰ نمونه پنیر سنتی در شهرستان کازرون مشاهده کردند که ۲۳ نمونه (۴۶٪) به استافیلوکوکوس اورئوس آلودگی داشته و ۱۳ مورد به نوع کواگولاز مثبت آلوده بودند. در تحقیقی که توسط موآرین و همکاران در فرانسه انجام شد، میزان آلودگی پنیرهای تهیه شده از شیر خام به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت ۸۲/۲٪ بود [13]. در مطالعه ای که توسط دونلی و همکاران انجام شد، شیوع استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت در پنیر چدار ۲۰٪ گزارش شد [14]. در تحقیقی که در موصل عراق توسط آبار و همکاران انجام شد، از ۲۳ نوع پنیر مختلف جمع آوری شده، ۳۱٪ آلوده به استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت بودند [15]. در تحقیقی که در شهر آگره از هند انجام شد، درصد شیوع استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت در پنیر ۱۲/۸٪ بود [16]. در مطالعه ای که توسط محمدی ثانی در شهرستان مشهد و قوچان انجام شد، از ۱۴۸ نمونه پنیر سنتی، ۳/۴٪ به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند [17]. در مطالعه ای که در ترکیه توسط تکینسن و وزدمیر انجام شد، ۳۰٪ پنیرهای ون اوتلو به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند [4]. در مطالعه ای که توسط سلطان دلال و همکاران در تهران انجام شد، از ۴۵۵ نمونه محصول لبنی، ۷۷ نمونه آنها به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند [18]. در مطالعه ملاحباس زاده و حاجی شیخ زاده در بخش قطور شهرستان خوی، ۵۳/۱۷۵٪ از پنیرهای سنتی آن منطقه به استافیلوکوکوس اورئوس آلوده بودند [8]. تفاوت نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج برخی محققین می تواند به دلیل اختلاف مناطق جغرافیایی جدایه های اخذ شده باشد. در مطالعه ای که در انگلستان توسط لیتل و همکاران انجام شد، نتایج تاکید بر این دارد که با ایجاد شرایط بهداشتی مناسب می توان از رشد باکتری ها جلوگیری کرد و پنیرهایی که از شیر خام به دست می آیند میزان استافیلوکوکوس اورئوس بیشتری نسبت به پنیرهای حاصل از شیر پاستوریزه دارند [5]. لازم به ذکر است که با گذشت زمان و افزایش مدت ماندگاری پنیر، شمارش استافیلوکوکوس اورئوس کاهش می یابد. از جمله دلایل کاهش شمارش میکروبی، افت pH و تولید عوامل ضد میکروبی توسط برخی باکتری های لاکتیک به خصوص باکتریوسین ها است [19]. در مطالعه اخیر رابطه معنی داری بین پارامترهای میزان نمک یا pH پنیر با شیوع استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت به دست نیامد. علت آن احتمالاً به دلیل این است که ۶۵٪ از نمونه های پنیر مورد مطالعه از نوع پنیر تازه بودند. در این مطالعه حدود ۹۵/۲٪ استافیلوکوکوس اورئوس کواگولاز مثبت جدا شده از نمونه های پنیر به بیش از یک آنتی بیوتیک مقاوم بودند. همچنین میزان مقاومت باکتری های جدا شده نسبت به آنتی بیوتیک های متی سیلین، تتراسایکلین و اکساسیلین به ترتیب ۷۶/۲٪، ۴۳٪ و ۳۸٪ بود که با نتایج مطالعه ملاحباس زاده و حاجی شیخ زاده که گزارش کردند که میزان مقاومت آنتی بیوتیکی استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از پنیر نسبت به متی سیلین، تتراسایکلین و اکساسیلین به ترتیب ۹/۳٪، ۴/۶۵٪ و ۲/۳۳٪ بود، تفاوت دارد. این اختلاف به دلیل تفاوت های جغرافیایی و نیز اختلاف در منشأ اکولوژیکی سویه های جدا شده (شیر، انسان و دام های مختلف) ناشی می شود. همچنین با مصرف بالای این دسته از آنتی بیوتیک ها به منظور درمان دام های بیمار در منطقه مراغه و ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری های این منطقه نیز می تواند مرتبط باشد. با مصرف



made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. Food Microbiol. 2008;25(2):304-12.

6- O'Brien M, Hunt K, McSweeney S, Jordan K. Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. Food Microbiol. 2009;26(8):910-4.

7- Tabatabai AM, Firozi R. Animal Bacterial Diseases. 1<sup>st</sup> Edition. Tehran: Moasese Entesharat Va Chap; 2001. pp: 8-25. [Persian]

8- Mahdavi S, Azizi Dehbokri M, Isazadeh A. Contamination of Chicken Meat With Salmonella spp Distributed in Mahabad City, Iran. Int J Enteric Pathog. 2018;6(3):65-8.

9- Mahdavi S, Tanhaevash E, Isazadeh A. Investigating the Presence and Expression of stx1 Gene in Escherichia coli Isolated From Women With Urinary Tract Infection Using Real-Time PCR in Tabriz, Iran. Int J Enteric Pathog. 2018;6(4):104-7.

10- Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol. 1992;30(7):1654-60.

11- Binderup ML, Pedersen GA, Vinggaard AM, Rasmussen ES, Rosenquist H, Cederberg T. Toxicity testing and chemical analyses of recycled fibre-based paper for food contact. Food Addit Contam. 2002;19(1):13-28.

12- Kaps M, Lamberson WR. Biostatistics for animal science. Oxfordshire: CABI; 2017.

13- Maurin F, Mazerolles G, Noel Y, Kodjo A. Identification and biotyping of coagulase positive staphylococci (CPS) in ripened French raw milk cheeses and their in vitro ability to produce enterotoxins. Revue Med Vet. 2004;155(2):92-6.

14- Donnelly CB, Black LA, Lewis KH. Occurrence of coagulase-positive staphylococci in cheddar cheese. Appl Microbiol. 1964;12(4):311-5.

15- Abbar FM, Mohammed MT. Identification of some enterotoxigenic strains of staphylococci from locally processed cheese. Food Microbiol 1986;3(1):33-6.

16- Singh P, Prakash A. Prevalence of coagulase positive pathogenic Staphylococcus aureus in milk and milk products collected from unorganized sector of Agra. Acta Agriculturae Slovenica. 2010;96(1):37-41.

17- Mohammadi Sani A. Investigation of contamination of cheeses in Mashhad and Quchan to Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus and Escherichia coli pathogens. 12<sup>th</sup> National Conference on Environmental Health, Tehran, Iran. Tehran: Shahid Beheshti University of Medical Sciences; 2009. [Persian]

18- Soltan Dallal MM, Salehipour Z, Eshraghi S, Mehrabadi JF, Bakhtiari R. Occurrence and molecular characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from meat and dairy products by PCR-RFLP. Ann Microbiol. 2010;60(2):189-96.

19- Mahdavi S, Isazadeh A. Lactobacillus casei suppresses hfq gene expression in Escherichia coli O157:H7. Br J Biomed Sci. 2019;76(2):1-3.

پنیرهای حاوی این گونه باکتری‌ها علاوه بر خطر بیماری‌زایی، خطر انتقال باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به بدن انسان وجود دارد که با رعایت اصول بهداشتی در زمان دوشش دام‌ها و پاستوریزاسیون شیر قبل از تهیه پنیر می‌توان به‌طور چشمگیری از پیامدهای ناشی از آن جلوگیری کرد.

به‌دلیل محدودیت‌های مالی و فضای آزمایشگاهی، امکان نمونه‌برداری بیشتر و انجام آزمایشات متعدد مولکولی روی باکتری‌های جدا شده میسر نشد.

بررسی حضور سایر باکتری‌های غذازاد در محصولات لبنی سنتی به‌ویژه پنیر در شهرستان مراغه و بیان ژن‌های حدت آنها در مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود.

### نتیجه‌گیری

با توجه به میزان بالای آلودگی پنیرهای سنتی در روستاهای شهرستان مراغه به استافیلوکوکوس ارئوس کواگولاز مثبت، تولید و توزیع آنها باید تحت شرایط بهداشتی صورت گیرد و لزوم اطلاع‌رسانی کافی در مورد خطرات بالقوه استفاده از آنها امری ضروری است.

**تشکر و قدردانی:** از کلیه کسانی که در انجام این مطالعه ما را یاری نموده‌اند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

**تابیدیه اخلاقی:** این مطالعه شامل تابیدیه اخلاقی نمی‌شود.

**تعارض منافع:** نویسندگان اعلام می‌دارند هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

**سهم نویسندگان:** سامان مهدوی (نویسنده اول)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۷۰٪)؛ علیرضا عیسی‌زاده (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۳۰٪)

**منابع مالی:** مطالعه حاضر با هزینه شخصی نویسندگان انجام شده است.

### منابع

1- Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. FEMS Microbiol Rev. 2012;36(4):815-36.

2- De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. Int J Food Microbiol. 2001;67(1-2):1-17.

3- Pinto B, Chenoll E, Aznar R. Identification and typing of food-borne Staphylococcus aureus by PCR-based techniques. Syst Appl Microbiol 2005;28(4):340-52.

4- Tekinşen KK, Tekinşen OC. Aflatoxin M1 in white pickle and Van otlu (herb) cheeses consumed in southeastern Turkey. Food Control. 2005;16(7):565-8.

5- Little C, Rhoades JR, Sagoo SK, Harris J, Greenwood M, Mithani V, et al. Microbiological quality of retail cheeses